

**Extração de Pigmentos  
Cloroplastídicos em Folhas de  
Castanheira-do-Brasil - Adaptações  
do Método com Acetona 80%**

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**  
**Embrapa Roraima**  
**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 47***

**Extração de Pigmentos  
Cloroplastídicos em Folhas de  
Castanheira-do-Brasil - Adaptações  
do Método com Acetona 80%**

***Reila Ferreira dos Santos***

***Karine Dias Batista***

***Cássia Ângela Pedrozo***

***Ayulle Thalía Watson Alcoforado***

***Marcos Miguel Mayer***

***Yarly Pereira da Silva***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Roraima**

Rodovia BR 174, Km 8 - Distrito Industrial

Caixa Postal 133 - CEP. 69.301-970

Boa Vista | RR

Fone/Fax: (95) 4009-7100

Fax: +55 (95) 4009-7102

www.embrapa.br

**Unidade responsável pelo conteúdo e pela edição**

Embrapa Roraima

**Comitê de Publicações da Unidade**

**Presidente:** Aloisio Alcantara Vilarinho

**Secretário-executivo:** Newton de Lucena Costa

**Membros:** Antônio Carlos Centeno Cordeiro  
Hyanameyka Evangelista Lima-Primo  
Jane Maria Franco Oliveira  
Karine Dias Batista  
Maria Fernanda Berlingieri Durigan  
Patrícia Costa  
Roberto Dantas Medeiros

**Revisão de texto:** Luiz Edwilson Frazão

**Normalização bibliográfica:** Jeana Garcia Beltrão Macieira

**Editoração Eletrônica:** Gabriela Beatriz de Lima

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)**

Embrapa Roraima

---

Santos, Reila Ferreira dos.

Extração de Pigmentos Cloroplastídicos em Folhas de Castanheira-do-brasil: Adaptações do Método com Acetona 80% / Reila Ferreira dos Santos, Karine Dias Batista, Cássia Ângela Pedrozo, Ayulle Thalía Watson Alcoforado, Marcos Miguel Mayer, Yarly Pereira da Silva. – Boa Vista, RR: Embrapa Roraima, 2019.

17 p. (Embrapa Roraima. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 47).

1. *Bertholletia excelsa*. 2. Metodologia de Extração. 3. Clorofilas. I. Santos, Reila Ferreira. II. Batista, Karine Dias. III. Pedrozo, Cássia Ângela. IV. Alcoforado, Ayulle Thalía Watson. V. Mayer, Marcos Miguel. VI. Silva, Yarly Pereira da. VII. Embrapa Roraima.

CDD. 631

## Sumário

<b>Resumo.....</b>	<b>05</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>06</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>07</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>09</b>
<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>10</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>13</b>
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>14</b>
<b>Referências.....</b>	<b>15</b>

# Extração de Pigmentos Cloroplastídicos em Folhas de Castanheira-do-Brasil - Adaptações do Método com Acetona 80%

---

*Reila Ferreira dos Santos<sup>1</sup>*

*Karine Dias Batista<sup>2</sup>*

*Cássia Ângela Pedrozo<sup>3</sup>*

*Ayulle Thalía Watson Alcoforado<sup>4</sup>*

*Marcos Miguel Mayer<sup>5</sup>*

*Yarly Pereira da Silva<sup>6</sup>*

## Resumo

O objetivo deste trabalho foi verificar o melhor ajuste do método de extração de pigmentos cloroplastídicos com acetona 80% em folhas de castanheira-do-brasil. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 3 repetições. Os tratamentos foram compostos por adaptações do método de extração de clorofilas e carotenoides, utilizando acetona 80%: 1) acetona 80%; 2) acetona 80% + adição de  $\text{CaCO}_3$  no momento da maceração; 3) acetona 80% com 5% de  $\text{CaCO}_3$  dissolvido; 4) discos foliares armazenados com acetona 80%, em freezer - 20°C por 7 dias antes das análises e 5) discos foliares armazenados com acetona 80% e 5% de  $\text{CaCO}_3$  dissolvido, em freezer -20°C por 7 dias antes das análises. As amostras foliares dos tratamentos 1, 2 e 3 foram analisadas logo após a coleta do material vegetal. Foram realizadas as análises de clorofilas *a* e *b* e carotenoides. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Não foram observadas diferenças entre as adaptações do método de extração com acetona 80% testadas, para nenhuma das variáveis estudadas. Todas as adaptações do método são eficientes para extração de pigmentos cloroplastídicos de folhas de castanheira.

**Palavras Chave:** clorofilas, *Bertholletia excelsa*, metodologia de extração.

---

<sup>1</sup> Bióloga, Mestranda em Agroecologia - Universidade Estadual de Roraima, Boa Vista, RR.

<sup>2</sup> Engenheira Agrônoma, doutora em Ciência do Solo, pesquisadora da Embrapa Roraima, Boa Vista, RR.

<sup>3</sup> Engenheiro Agrônomo, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Roraima, Boa Vista, RR.

<sup>4</sup> Acadêmico de Licenciatura Ciências Biológicas - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Roraima, RR.

<sup>5</sup> Acadêmico de Licenciatura Ciências Biológicas - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Roraima, RR.

<sup>6</sup> Acadêmico de Licenciatura Ciências Biológicas - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Roraima, RR.

# Chloroplastidic Pigments Extraction in Brazil Nut Leaves - 80% Acetone Method Adaptations

---

## Abstract

The objective of this work was to verify the best fit of the chloroplastidic pigment extraction method with 80% acetone in Brazil nut tree leaves. The experiment was carried out in a completely randomized design with 5 treatments and 3 replicates. The treatments were composed with chlorophyll and carotenoid extraction method, using 80% acetone adaptations: 1) 80% acetone; 2) 80% acetone + addition of  $\text{CaCO}_3$  at the maceration; 3) 80% acetone with 5%  $\text{CaCO}_3$  dissolved; 4) foliar disks stored with 80% acetone in freezer at  $-20^\circ\text{C}$  for 7 days before analysis and 5) foliar disks stored with 80% acetone and 5%  $\text{CaCO}_3$  dissolved, in freezer at  $-20^\circ\text{C}$  for 7 days before analysis. Leaf samples from treatments 1, 2 and 3 were analyzed shortly after plant material harvest. Chlorophyll *a* and *b* and carotenoids analyzes were done. Data were submitted to analysis of variance and the means were compared by Tukey test at 5% probability. No differences were observed between the adaptations of the 80% acetone extraction method tested for any of the variables studied. All the adaptations of the method are efficient for extracting chloroplastidic pigments from Brazil nut leaves.

**Keywords:** chlorophylls, *Bertholletia excelsa*, extraction methodology.

## **Introdução**

Nos tecidos vegetais, as clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes e, juntamente com os carotenoides, exercem importante função no processo fotossintético (Taiz et al., 2017). O conhecimento sobre a concentração dos pigmentos cloroplastídicos em folhas auxilia no entendimento do processo de captação de energia pelas plantas.

Dependendo de diversos fatores, como o estágio de desenvolvimento da planta, a luminosidade, a cultivar, a condição nutricional da planta, etc., os teores dos pigmentos fotossintéticos apresentam variações e a sua quantificação requer o uso de métodos que se baseiam em leituras de absorbância. Há diferentes métodos que possibilitam o estudo de pigmentos fotossintéticos nas folhas, os quais podem ser não destrutivos, com o uso de clorofilômetro e SPAD ou destrutivos, através de solventes, com destaque para a acetona, o álcool (Gama et al., 2014; Lichtenthaler, 1987) e o DMSO (dimetilsulfóxido) (Colombo et al, 2018).

Os métodos não destrutivos apenas fornecem valores de índices de clorofila e não a concentração dos pigmentos foliares, uma vez que isso só é possível através de extração (Tonin et al., 2015). Tradicionalmente, a metodologia mais empregada na extração desses pigmentos utiliza-se da destruição das folhas (Jesus; Marengo, 2008; Tonin et al., 2015) sendo que, o uso de acetona 80% em conjunto com o processo de maceração tem demonstrado ampla utilização na determinação de clorofilas e carotenoides (Machado et al., 2015; Peloso et al., 2017; Lima et al., 2017).

Geralmente os protocolos para quantificação dos pigmentos cloroplastídicos precisam ser adaptados à realidade dos laboratórios, ou mesmo às diferentes espécies. Isso se traduz na necessidade de aprimoramento das técnicas de análises consideradas clássicas, estabelecendo assim novos protocolos ou protocolos ajustados para extração de pigmentos. Segundo Santos et al. (2008), o ajuste antecipado de protocolos para cada espécie contribui para a extração e a conservação dos pigmentos cloroplastídicos. Barbieri Junior et al. (2010) ressaltam que, em se tratando da definição de protocolos operacionais sob condições de campo e, que envolvam comparar um elevado número de tratamentos e repetições, é admissível que ocorra perda de uma

parcela de precisão. Entretanto, o rigor das comparações não é afetado.

A acetona 80% (Lichtenthaler; Wellburn, 1983) é um método usado para extração de clorofilas e carotenoides de diversas espécies vegetais. Santos et al. (2008) trabalharam com a extração de pigmentos foliares de porta-enxertos de videira micropropagados, Borella et al. (2009) determinaram o teor de clorofilas *a* e *b* em plântulas de alface e Magalhães et al. (2010) verificaram características fisiológicas do aparato fotossintético durante o processo de aclimação de mudas de acariquara submetidas à alta irradiância. Nesses três estudos foi utilizada acetona 80% para extração de pigmentos fotossintéticos. Em castanheira-do-brasil, Souza et al. (2013) e Souza et al. (2017) também utilizaram o método com acetona descrito por Lichtenthaler e Wellburn (1983), para extração de pigmentos cloroplastídicos de plantas jovens cultivadas sob diferentes condições hídricas e de irradiância.

Diferentes estudos (Monge et al., 1984; Valle-Tascón et al., 1994; Solovchenko et al., 2001) mostram alterações do método descrito por Lichtenthaler e Wellburn (1983) para extração de clorofilas e carotenoides. Uma das alterações é o uso ou não de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) juntamente com a acetona para extrair os pigmentos. Pompelli et al. (2012) e Sindhu et al. (2015) utilizaram o carbonato de cálcio, enquanto Sumanta et al. (2014) não utilizaram o reagente para extrair clorofilas de diferentes espécies vegetais. O  $\text{CaCO}_3$  possui importante função de prevenir a ação de clorofilases (Pompelli et al., 2012), impedindo, dessa forma, a degradação das clorofilas (Sindhu et al., 2015).

Evidencia-se, dessa forma, a necessidade de testes para definir o melhor método ou ajuste de metodologia para extração de pigmentos foliares de determinada espécie vegetal. Portanto, este trabalho teve como objetivo verificar o melhor ajuste do método de extração de pigmentos cloroplastídicos com acetona 80% em folhas de castanheira-do-brasil.



## **Material e Métodos**

O trabalho foi realizado em julho de 2018. A concentração de pigmentos cloroplastídicos (carotenoides, clorofilas *a* e *b* e clorofilas totais) foi determinada através de diferentes ajustes na metodologia descrita por Lichthenthaler (1987), constituindo cinco tratamentos, a saber: 1) acetona 80%; 2) acetona 80% + adição de  $\text{CaCO}_3$  no momento da maceração; 3) acetona 80% com 5% de  $\text{CaCO}_3$  dissolvido; 4) discos foliares armazenados com acetona 80%, em freezer  $-20^\circ\text{C}$  por 7 dias antes das análises e 5) discos foliares armazenados com acetona 80% e 5% de  $\text{CaCO}_3$  dissolvido, em freezer  $-20^\circ\text{C}$  por 7 dias antes das análises. As amostras foliares dos tratamentos 1, 2 e 3 foram analisadas logo após a coleta do material vegetal. Em todos os tratamentos, o material vegetal foi macerado com pequena quantidade de areia lavada, como agente físico e inerte, para facilitar a maceração.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (adaptações do método de extração com acetona 80%) e três repetições. Cada parcela experimental foi constituída por seis discos foliares.

Discos foliares do terceiro par de folhas, a partir do ápice, de uma única castanheira jovem, foram amostrados utilizando-se amostrador de metal de 10,15 mm de diâmetro. As castanheiras eram cultivadas em vaso e sob tela com sombreamento de 50% no viveiro da Embrapa Roraima. Durante a coleta, tomou-se o cuidado de não coletar parte da nervura central da folha amostrada. Os discos foliares foram armazenados em microtubo de 2 ml contendo a solução extratora, de acordo com cada tratamento, sendo protegidos da luz pelo uso de papel alumínio. As amostras foram então acondicionadas em caixas térmicas com gelo para o transporte até o laboratório, onde as amostras dos tratamentos 4 e 5 foram armazenados em freezer  $-20^\circ\text{C}$  e as amostras dos demais tratamentos foram imediatamente processadas.

Todo o processo de extração e análise foi realizado com o mínimo de luz possível para evitar fotooxidação dos pigmentos. Os discos foliares foram macerados em almofariz, conforme a descrição de cada tratamento, juntamente com uma pequena quantidade de areia. Uma vez macerado, o material foi filtrado em papel filtro qualitativo  $80\text{g/m}^2$  com auxílio de funil de vidro de 60 mm, em balão volumétrico de 25 ml, previamente

envolvido com papel alumínio. Ao término da filtração, completou-se o volume do balão com acetona 80%.

De posse dos extratos, foram realizadas as leituras de absorbância em espectrofotômetro UV-VIS, modelo SP – 2000 da marca BEL, nos seguintes comprimentos de onda: 663, 647 e 470 nm, para clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, respectivamente. Em seguida foram calculadas as concentrações de cada pigmento cloroplastídico, utilizando as equações descritas por Lichthenthaler (1987).

Os dados obtidos foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Posteriormente, foi realizada análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2011).

## Resultados e Discussão

Os dados das variáveis avaliadas seguiram distribuição normal. Não foram observadas diferenças entre as adaptações do método de extração testado, para nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 1). Barbosa et al. (2008) relataram que, de maneira geral, o teor de carotenoides é mais baixo em relação aos demais pigmentos fotossintetizantes. Esta afirmação está de acordo com os resultados obtidos, onde as médias para Chl *a*, Chl *b*, Chl *a+b* e carotenoides foram 13,8293; 6.6160; 20.4440 e 4.2313  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , respectivamente.

Segundo Solovchenko et al. (2001), o  $\text{CaCO}_3$  proporcionou melhores resultados para extração de pigmentos cloroplastídicos, evitando a alteração das cores das clorofilas por oxidação ou feofotização durante a extração. O  $\text{CaCO}_3$  previne a ação de clorofilases (Pompelli et al., 2012) na degradação das clorofilas. Ainda que no presente trabalho, o  $\text{CaCO}_3$  não tenha influenciado nos valores das concentrações de clorofilas, recomenda-se o uso do carbonato a fim de proteger a degradação desses pigmentos, quando se fizer necessário o armazenamento do extrato por um período de tempo mais longo.

**Tabela 1.** Concentração de clorofila *a*(Chl *a*); clorofila *b*(Chl *b*); clorofilas totais(Chl *a* + *b*) e carotenoides em folhas de castanheira-do-brasil através de cinco adaptações do método de extração de pigmentos cloroplastídicos com acetona 80%

Tratamento*	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl <i>a</i> + <i>b</i>	Carotenoides
----- $\mu\text{g cm}^{-2}$ -----				
1	12,9966 A	7,1600 A	20,1533 A	3,9233 A
2	13,3700 A	7,0400 A	20,4033 A	3,9466 A
3	13,6300 A	6,8600 A	20,4900 A	4,4700 A
4	13,8300 A	5,9366 A	19,7666 A	4,2866 A
5	15,3200 A	6,0833 A	21,4066 A	4,5300 A
<b>QMR</b>	<b>1,8249<sup>ns</sup></b>	<b>1,9027<sup>ns</sup></b>	<b>5,8542<sup>ns</sup></b>	<b>0,1719<sup>ns</sup></b>
<b>CV (%)</b>	<b>9,77</b>	<b>20,85</b>	<b>11,84</b>	<b>9,80</b>
<b>Média</b>	<b>13,8293</b>	<b>6,6160</b>	<b>20,4440</b>	<b>4,2313</b>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. ns: não significativo pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

\* 1) acetona 80%; 2) acetona 80% + adição de  $\text{CaCO}_3$  no momento da maceração; 3) acetona 80% com 5% de  $\text{CaCO}_3$  dissolvido; 4) discos foliares armazenados com acetona 80%, em freezer -20 °C por 7 dias antes das análises e 5) discos foliares armazenados com acetona 80% e 5% de  $\text{CaCO}_3$  dissolvido, em freezer -20 °C por 7 dias antes das análises.

Em plantas de *Beta vulgaris* L. var. *Sacharifera*, Monge et al. (1984) testaram 4 extratores (metanol, etanol, acetona 80% e acetona 100%) para a quantificação dos pigmentos fotossintéticos. Os resultados permitiram concluir que o método extrator mais eficiente foi aquele que utilizou a acetona 100%.

Quanto ao período de armazenamento das amostras para a extração dos pigmentos por meio de diferentes solventes, Zotarelli et al. (2003) observaram que em folhas de milho, não houve diferenças nos conteúdos de clorofila extraídas após o período de 72 e 104 horas de imersão das folhas em dois solventes diferentes. Por outro lado, Barbosa et al. (2008) obtiveram teores mais elevados de pigmentos cloroplastídicos com a incubação dos discos foliares de caqui, figo e pêssago armazenados em acetona por 48 horas no refrigerador. Neste segundo estudo, após o período mencionado, os teores dos pigmentos cloroplastídicos não foram alterados, mantendo-se estáveis por até 96 horas.

Em folhas de capim Tifton, Barbieri et al. (2010) observaram que após 48 horas, os teores das clorofilas *a*, *b* e total, extraídos através de diferentes protocolos (N-dimetilformamida; acetona 80% (Arnon, 1949); álcool absoluto; acetona 80% (Porra et al., 1989); e DMSO), se mantiveram estáveis. Os autores consideraram que após esse período houve uma efetiva “saturação” do processo de extração. No presente trabalho, o tempo de armazenamento do extrato por 7 dias não influenciou na extração dos pigmentos.

Apesar da ausência de diferença entre os tratamentos, recomenda-se o uso de  $\text{CaCO}_3$  na extração de pigmentos cloroplastídicos de folhas de castanheira-do-brasil para o caso em que seja necessário o armazenamento do extrato por período longo, para posterior análise no espectrofotômetro, uma vez que o reagente poderá prevenir a degradação da clorofila. O acréscimo do carbonato nas análises não irá aumentar o custo da análise de forma significativa pois é utilizada uma quantidade pequena do reagente e trata-se de produto de custo baixo.

## **Conclusão**

Todas as adaptações do método com acetona 80% se mostram eficientes na extração de pigmentos cloroplastídicos em folhas de castanheira-do-brasil.

## **Agradecimentos**

À Embrapa, pelo apoio financeiro e técnico, à Capes pela bolsa de mestrado e ao CNPq pelas bolsas PIBIC.

## Referências

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, n. 1, p.1-15, 1949.

BARBOSA, J. Z.; SCOPEL, W.; VIEIRA, M. L. Procedimentos para extração de pigmentos fotossintetizantes em espécies frutíferas. **Evidência-Ciência e Biotecnologia**, v. 8, n. 1-2, p. 29-42, 2008.

BARBIERI JUNIOR, É.; JOSÉ, R. O. P. R. M.; MORENZI, F.; RIBEIROII, R. C. Comparação de métodos diretos de extração e quantificação dos teores de clorofilas em folhas do capim-Tifton 85. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 633-636, 2010.

BORELLA, J.; WANDSCHEER, A. C. D.; BONATTI, L. C.; PASTORINI, L. H. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Persea americana* Mill. sobre *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 3, 2009.

COLOMBO, R.; CELESTI, M.; BIANCHI, R.; CAMPBELL, P. K.; COGLIATI, S.; COOK, B. D.; CORP, L. A.; DAMM, A.; DOMECH, A.; GUANTER, L.; JULITTA, T.; MIDDLETON, E. M.; NOORMETS, A.; PANIGADA, C.; PINTO, F.; RASCHER, U.; ROSSINI, M.; SCHICKLING, A. Variability of sun-induced chlorophyll fluorescence according to stand age-related processes in a managed loblolly pine forest. **Global Change Biology**, v. 24, p. 2980-2996, 2018.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GAMA, A. D. S.; CAVALCANTE, P. D. H.; SOARES, E. K. S.; BARROS, F. N.; DE OLIVEIRA, I. S. T.; SANTANA, J. D. O. MAPELI, A. M. Utilização de diferentes métodos para análise do teor de clorofila em folhas de Cajuí (*Anacardium sp.* L.). **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 6, 2014. Disponível em: <<http://www.orbital.ufms.br/index.php/Chemistry/article/view/639>>. Acesso em: 20 set. 2018.

LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN, A. Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v. 11, p. 591-592, 1983.

LICHTENTHALER H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.

LIMA, J. M. de; THOMAZINI, M.; TRINDADE, C. S. F.; SANTOS, M. G. dos. Extração de  $\beta$ -caroteno da macaúba. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 6, p. 0796-0800, 2017.

JESUS, S. V. de; MARENCO, R. A. O SPAD-502 como alternativa para a determinação dos teores de clorofila em espécies frutíferas. **Acta Amazônica**, v. 38, p. 815-818, 2008.

MAGALHÃES, N. dos S.; MARENCO, R. A.; MENDES, K. R. Aclimação de mudas de acariquara à alta irradiância. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 7, p. 687-694, 2010.

MACHADO, L. M. M.; NASCIMENTO, R. S.; ROSA, G. S. Estudo da extração de óleo essencial e de compostos bioativos das folhas de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 5609-5616, 2015.

MONGE, E.; VAL, J. ZARAGOZA Estación Experimental de Aula Dei. Análisis cuantitativo de pigmentos en plantas superiores por HPLC. **Anales de la Estación Experimental de Aula Dei**, v. 17, p. 60-66, 1984.

PELOSO, A. F.; TATAGIBA, S. D.; AMARAL, J. F. T. O déficit hídrico promove diminuição dos pigmentos fotossintéticos em folhas de *Coffea arabica* L., cultivar catuaí vermelho. 2017. Disponível em: <[http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/9304/10\\_43-CBPC-2017.pdf?sequence=1](http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/9304/10_43-CBPC-2017.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 20 set. 2018.

POMPELLI, M. F.; FRANÇA, S. C.; TIGRE, R. C.; OLIVEIRA, M. T.; SACILOT, M.; PEREIRA, E. C. Spectrophotometric determinations of chloroplastidic pigments in acetone, ethanol and dimethylsulphoxide. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, p. 52-58, 2012.

PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A.; KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectrometry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 975, n. 3, p.384-394, 1989.

SANTOS, R. P.; DA CRUZ, A. C. F.; IAREMA, L.; KUKI, K. N.; OTONI, W. C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Ceres**, v. 55, n. 4, 2008.

SINDHU, P.; SAHA RMA, A.; PROOJA, PRIYA. Total chlorophyll and total protein content in wheat (*Triticum aestivum*) grown under arsenic stress. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 6, p. 5072-5075, 2015.

SOUZA, C. L.; FERREIRA, T. R.; CHAGAS, J. R.; CORREA, T. B.; PEREIRA, T. S.; LOBATO, A. K. Efeitos do déficit hídrico nas clorofilas *a* e *b* de *Bertholletia excelsa* (Lecythidaceae). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 64., 2013. Resumos... Belo Horizonte, 2013. Disponível em: <<http://www.botanica.org.br/trabalhoscientificos/64CNBot/resumo-ins20001-id4197.pdf>>. acesso em: 20 set. 2018.

SOUZA, C. S. do C. R. de; SANTOS, V. A. H. F. dos; FERREIRA, M. J.; GONÇALVES, J. F. de C. Biomassa, crescimento e respostas ecofisiológicas de plantas jovens de *Bertholletia excelsa* Bonpl. submetidas a diferentes níveis de irradiância. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 2, 2017.

SOLOVCHENKO, A.; CHIVKUNOVA, O.; MERZLYAK, M.; RESHETNIKOVA, I. A spectrophotometric analysis of pigments in apples Russ. **Journal of Plant Physiology**, v. 48, p. 693-700, 2001.

SUMANTA, N.; HAQUE, C. I.; NISHIKA, J.; SUPRAKASH, R. Spectrophotometric



Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents. **Research Journal of Chemical Sciences**, v. 4, p. 63-69, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TONIN, J.; MACHADO, J. T. M.; ROHRIG, B.; SOBUCKI, L.; RICHTER, A. F.; BETEMPS, D. L.; SCHNEIDER, E. P. Modelos lineares e não-lineares para determinação indireta de clorofila em folhas de morangueiro. **Revista Interdisciplinar de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 3, n. 1, 2015.

VALLE-TASCÓN, S.; SANZ, M. J.; CALATAYUD, A.; BARRENO, E. Coeficientes de extinción de clorofilas y feofitinas (a y b) en DMSO y ecuaciones para el cálculo de sus concentraciones. **Studia Botanica**, v. 13, 1994.

ZOTARELLI, L.; CARDOSO, E. G.; PICCININ, J. L.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; TORRES, E.; ALVES, B. J. R. Calibração do medidor de clorofila Minolta SPAD-502 para avaliação do conteúdo de nitrogênio do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1117-1122, 2003.



---

***Roraima***

MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA  
**BRASIL**  
GOVERNO FEDERAL